

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต
 Process Development for Crocodile Blood Collection with
 Crocodile Life Maintaining

ได้รับทุนวิจัยประจำปี 2554 จำนวนเงิน 373,164 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ มกราคม 2555 ถึง มกราคม 2556 (ปีที่ 2)

ชื่อผู้วิจัย

นายวิน เชยชมศรี ปร. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร).
 ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264

นางสาวจินดาวรรณ สิริันทวีเนติ Ph.D.(Agricultural Science)
 ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3262

นางสุดาวรรณ เชยชมศรี Dr. Agr. Agronomy (Insect Virus Molecular Biology)
 ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน
 โทรศัพท์ 0-3435-1399, 0-3428-1092 ต่อ 460

นางสาววิภาภรณ์ ณ ถลาง Dr. (Veterinary Medicine). ฝ่ายคั่นคว่ำและวิจัย สถาบันคั่นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2942-8629-35

บทคัดย่อ

เลือดจระเข้แห้งจากจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) มีผู้บริโภคใช้เป็นอาหารเสริมและเครื่องยาสัตว์วัตถุ เมื่อต้องการเจาะเลือดให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไประเหิดแห้งภายใต้ความเย็นจัดเพื่อใช้เป็นสารเสริมอาหารนั้น ต้องเจาะเลือดจากจระเข้ที่เข้าสู่กระบวนการฆ่าหละในโรงฆ่า ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงพัฒนาการเจาะเก็บเลือดปริมาณมากจากจระเข้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยไม่ทำลายชีวิต เพื่อเป็นการรักษาชีวิตของจระเข้ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปริมาณเลือดในตัวจระเข้พันธุ์ไทยที่มีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 22.71 ± 0.81 กิโลกรัม มีปริมาณเลือดเฉลี่ย 598.33 ± 23.17 มิลลิลิตรต่อตัว เมื่อทำการทดลองโดยเจาะเก็บเลือดจากจระเข้ น้ำหนักเฉลี่ย 27 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 191 เซนติเมตร หรืออายุประมาณ 4-5 ปี จำนวน 20 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว คือ กลุ่มควบคุม เจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ ระยะเวลา 12 สัปดาห์ กลุ่มทดลองที่ 1 เก็บตัวอย่างเลือด 150 มิลลิลิตร เมื่อสัปดาห์ที่ 1 และ 12 และเจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 2-11 กลุ่มทดลองที่ 2 เก็บตัวอย่างเลือด 150 มิลลิลิตร เมื่อสัปดาห์ที่ 1 และ 12 และเจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 4 และ 8 กลุ่มทดลองที่ 3 เก็บตัวอย่างเลือด 150 มิลลิลิตร เมื่อสัปดาห์ที่ 1 และ 12 เมื่อศึกษาเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาพบว่า ค่าทางโลหิตวิทยาของเลือดจระเข้ที่เจาะในปริมาณ 10 และ 150 มิลลิลิตรจากทุกกลุ่มทดลอง ไม่มีความแตกต่างจากจระเข้กลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) ในทุกช่วงเวลาของการทดลอง แสดงว่าจระเข้สามารถเสริมสร้างเม็ดเลือดได้ดีและเร็วจึงดำรงชีวิตได้เป็นปกติ และผลจากการตรวจค่าชีวเคมีของเลือดจระเข้ที่ใช้ในการทดลองยังแสดงว่าการเจาะเลือดปริมาณ 150 มิลลิลิตรหรือประมาณ 25% ของเลือดทั้งหมดในร่างกายไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพจระเข้ ดังนั้นการเจาะเลือดจระเข้ในปริมาณที่มากถึง 25% ของเลือดทั้งหมดในร่างกายจึงเป็นวิธีการที่ยอมรับได้ วิธีการนี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการเก็บเลือดเพื่อใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์โดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้

Abstract

Freeze-dried blood from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) is a natural product which can serve as food supplement. It has been widely consumed not only for its nutritious composition, but also for its claimed medicinal value. For collecting a large volume of blood, the blood is commonly collected from crocodiles at the slaughterhouse before they are killed. Thus, the present study aims to develop the blood collection process without killing animals in order to extend their life and keep them healthy. A preliminary study found that the average blood volume of Siamese crocodile at an average weight 22.71 ± 0.81 kg was 598.33 ± 23.17 ml per crocodile. Blood collecting was performed from 20 captive breeding crocodiles. These crocodiles were 4-5 years of age, with an average weight 27 kg and 191 cm in length. The crocodiles were randomly divided into control group and 3 experimental groups. Ten milliliters of blood were collected from control group every week for 12 weeks. Experimental group 1, blood samples were withdrawn 150 ml on week 1 and 12 and collected 10 ml weekly on week 2-11. Experimental group 2, blood samples were withdrawn 150 ml on week 1 and 12 and collected 10 ml on week 4 and 8. Experimental group 3, blood samples were withdrawn 150 ml on week 1 and 12. All blood samples were subjected to hematological and biochemical analyses. The results showed that there were no significant differences ($p < 0.05$) in hematological values among the blood samples taken from experimental group 1, 2, 3 and those of the control group at all time intervals. The results of biochemical values also revealed that large volume blood collection up to 150 ml or 25% of the total blood volume had no detrimental effect on crocodile health. Therefore, large volume blood withdrawal can be accepted and used for harvesting of crocodile blood without killing animals. The results from the present study offer a possible alternative to conventional way for commercial crocodile blood collection.

บทนำ

ปัจจุบันได้มีการคิดค้นวิธีการเจาะเก็บเลือดปริมาณมากจากจระเข้ (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549) ขณะที่จระเข้มีชีวิต ทำให้ได้วัตถุดิบเลือดจระเข้ที่สะอาด นำมาทำระเหิดแห้งภายใต้ความเย็นจัด (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5074, 4 กันยายน 2552) เพื่อพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับคน มีการทดสอบความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง หลังจากที่ให้สัตว์ทดลองบริโภคแล้วพบว่ามีความปลอดภัยสูง รวมทั้งยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างในร่างกายสัตว์ทดลองที่กินเลือดจระเข้ด้วย (Chaeychomsri *et al.*, 2004a, 2004b, 2006 ; Siruntawineti *et al.*, 2004b) ซึ่งจระเข้ที่นำมาเจาะเก็บเลือดปริมาณมากจะต้องเสียชีวิตเพราะจะนำเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง นำเนื้อ และหนัง ส่งออกขายทั้งในและต่างประเทศ เมื่อมีการเผยแพร่ผลการวิจัยผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แห่งที่ได้สู่ประชาชน โดยความอนุเคราะห์จากฝ่ายประชาสัมพันธ์ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ไปยังสื่อสิ่งพิมพ์ สื่อวิทยุ และสื่อโทรทัศน์ ได้มีประชาชนจำนวนมากให้ความสนใจขอบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จากการสอบถามและเก็บข้อมูล ก่อนและหลังการบริโภคผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แห่งจากผู้บริโภคที่มีปัญหาสุขภาพกลุ่มต่างๆ พบผลสัมฤทธิ์ที่ดีของเลือดจระเข้แห่งในกลุ่มผู้บริโภคที่เป็นโรคสำคัญหลายโรค ทั้งในกลุ่มโรคไม่ติดเชื้อ (เช่น โรคโลหิตจาง โรคภูมิแพ้ที่มีอาการหอบเหนื่อย โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง/ต่ำ) และกลุ่มโรคติดเชื้อ (เช่น โรคเอดส์) ซึ่งการประเมินนี้ได้พิจารณาพร้อมกับผลข้อมูลทางการแพทย์ของผู้บริโภคซึ่งเป็นผู้ป่วยมีอยู่และอนุญาตให้รับทราบ จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการบริโภคเลือดจระเข้แห่ง แต่มีผลสะท้อนกลับจากผู้บริโภคบางกลุ่มที่ไม่ต้องการให้จระเข้เสียชีวิตเพราะเป็นสัตว์ที่อายุยืน

ดังนั้นการศึกษาการพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต จึงเป็นสิ่งใหม่ที่ไม่เคยมีการศึกษาในจระเข้และเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะประเทศไทยที่ประชาชนส่วนมากนับถือศาสนาพุทธที่ไม่คิดที่จะเบียดเบียนชีวิตสัตว์ แต่มีปัญหาสุขภาพ ซึ่งการพัฒนาเป็นการนำวัสดุจากธรรมชาติโดยไม่มีการปรุงแต่งด้วยสารสกัดต่างๆ สารป้องกันโลหิตแข็ง และเป็นการช่วยลดมลพิษจากการทิ้งเลือดลงสู่แหล่งน้ำ ในอุตสาหกรรมจระเข้ ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย เพิ่มมูลค่าเพิ่มให้แก่เลือดจระเข้ เกิดการค้าระหว่างประเทศนารายได้เข้าสู่ประเทศได้

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เลือดสัตว์ถูกใช้เป็นส่วนประกอบทางโภชนาการและทางการเสริมสร้างความแข็งแรงให้ร่างกาย มาเป็นเวลานานหลายปี เลือดประกอบด้วยสองส่วนที่สำคัญคือ น้ำเลือด (plasma) และ เซลล์เม็ดเลือดต่างๆ (blood cells) ซึ่งทั้งสองส่วนมีความแตกต่างกันด้วยคุณสมบัติทางชีวภาพ และองค์ประกอบทางเคมี การศึกษาในเลือดสุกรซึ่งถูกใช้มากที่สุดเป็นส่วนประกอบอาหารต่างๆ พบว่าในน้ำเลือดมีโปรตีนน้อยและมีน้ำมากกว่าในส่วนของเซลล์เม็ดเลือด แต่โปรตีนที่พบในน้ำเลือดส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย (Petczyn'ska and Libelt, 1999) ในเลือดของลูกวัวมีโปรตีนมากและน้ำน้อยกว่าในวัวที่โตเต็มที่ ในน้ำเลือดลูกวัวประกอบด้วยน้ำมากกว่าในวัวเต็มวัยแต่มีปริมาณโปรตีนที่ไม่แตกต่างกัน ในเม็ดเลือดแดงของลูกวัวมีโปรตีนน้อยและน้ำมากกว่า ถ้าไม่คำนึงถึงอายุในส่วนน้ำเลือดวัวมีโปรตีนน้อยกว่าเป็น 4 เท่า และมีน้ำมากกว่าประมาณ 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับส่วนของเม็ดเลือดแดง โปรตีนที่พบในน้ำเลือดของทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกายสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำเลือดของลูกวัวและวัวจึงเป็นสารเสริมที่ดีของผลิตภัณฑ์เนื้อ (Betkot, 2001) ในเลือดของไก่มีโปรตีนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับในสุกร หรือลูกวัว แต่ไม่แตกต่างกับในวัว โดยในน้ำเลือดไก่มีโปรตีนน้อยและมีน้ำมากกว่าในสัตว์ดังกล่าว ในส่วนของเม็ดเลือดแดงของไก่และสุกรมีโปรตีนไม่แตกต่างกัน โดยมีโปรตีนและเถ้ามากกว่า น้ำน้อยกว่าในลูกวัวและวัวเต็มวัย ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในน้ำเลือดไก่ใกล้เคียงกับในวัว แต่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับในสุกร ในเม็ดเลือดแดงของไก่มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงที่สุด คุณค่าทางโภชนาการของน้ำเลือดไก่มีค่าสูงใกล้เคียงกับในวัว และมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับในสุกร (Betkot & Petczynska Libelt, 2002)

การศึกษาน้ำเลือด (ซีรัม) ของอัลลิเกเตอร์ (*Alligator mississippiensis*) ซึ่งเป็นจระเข้ที่พบได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 16 ชนิด ได้แก่ *Klebsiella oxytoca* (49131), *Providencia stuartii* (33672), *Escherichia coliform* (25922), *Proteus mirabilis* (43607), *Enterobacter aerogenes* (49469), *Salmonella typhimurium* (14028), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Citrobacter freundii* (C109820), *Shigella sonnei* (25931), *Shigella dysenterae* (13313), *Salmonella poona* (4840), *Yersenia enterocolitica* (9610), *Staphylococcus pyrogenes* (19615), *Streptococcus epidermitis* (19615), *Staphylococcus aureus* (6538) และ *Enterococcus faecalis* (29212) แต่เมื่อนำน้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์มาบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่าน้ำเลือดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ และจากการที่สารโปรตีนบางชนิดที่มีชื่อว่า คอมพลีเมนต์ ซึ่งเป็น

ส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่เกิด สามารถถูกทำลายที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เวลานาน 30 นาที และจากผลการทดสอบทางภูมิคุ้มกันโดยใช้แอนติบอดีต่อคอมพลิเมนต์ของคน จึงสรุปผลได้ว่าคอมพลิเมนต์ในน้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ และพบว่าน้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำเลือดของมนุษย์ โดยที่น้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 100% ในขณะที่น้ำเลือดของมนุษย์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เพียง 35% (Merchant *et al.*, 2003)

เนื้อเยื่อต่างๆ ของจระเข้หลายๆ ชนิดพันธุ์มีการแสดงประสิทธิภาพและขอบเขตที่กว้างของการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ ตัวอย่างเช่น ในปี ค. ศ. 1999 Shaharbanay และคณะ ได้รายงานผลการศึกษาศาสตร์จากเนื้อเยื่อของจระเข้แม่น้ำไนล์ (Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*) มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ชนิดต่างๆ จากรายงานการศึกษาจำนวนมากทางห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่า ซิริมของอัลลิเกเตอร์ (*Alligator mississippiensis*) ซึ่งเป็นจระเข้ที่มีถิ่นกำเนิดและพบมากในประเทศอเมริกา แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Merchant *et al.*, 2003, 2005b) ฤทธิ์ต้านโปรโตซัว (Merchant *et al.*, 2004) และฤทธิ์ต้านไวรัส (Merchant *et al.*, 2005a) เช่นเดียวกับที่มีรายงานฤทธิ์ต้านจุลชีพในซิริมของจระเข้พันธุ์ไทย (*C. siamensis*) (Siruntawinetai *et al.*, 2004) และไคแมน (*Caiman latirostris*) ซึ่งเป็นจระเข้ที่มีถิ่นกำเนิดและพบมากในประเทศแถบแอฟริกา (Merchant *et al.*, 2006)

ซิริมของอัลลิเกเตอร์มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งสามารถลดอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียนี้ได้เป็น 10 เท่า และมีขอบเขตของการออกฤทธิ์ที่มากกว่าในแบคทีเรียเมื่อเทียบกับซิริมของคน ฤทธิ์เหล่านี้จะลดลงเมื่อมีการบ่มซิริมด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease) ก่อนการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าลักษณะการทำงานของสารจำพวกโปรตีน และเมื่อทำการบ่มซิริมที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ในการทำลายฤทธิ์การทำงานของโปรตีนที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดคือ คอมพลิเมนต์ ก็สามารถทำลายฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบได้เช่นกัน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของซิริมอัลลิเกเตอร์เกิดขึ้นได้รวดเร็วในหลอดทดลอง ภายในเวลา 5 นาที และมีฤทธิ์สูงสุดที่เวลา 20 นาที และมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ซึ่งการแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีน้อยลงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และได้ให้สมมุติฐานว่าคุณสมบัติของการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของซิริมอัลลิเกเตอร์น่าจะเกิดจากการทำงานของระบบคอมพลิเมนต์ (Merchant *et al.*, 2003) ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยในซิริมของจระเข้พันธุ์ไทย (วิน และคณะ, 2546 ; Siruntawinetai *et al.*, 2003, 2004)

ต่อมาได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านโพโรทิว *Naegleria gruberi* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบฤทธิ์ต้านโพโรทิวของ 25% ซิรั้มอัลลิเกเตอร์ และถ้าใช้ซิรั้มที่ไม่ได้เจือจาง โพโรทิวสามารถรอดชีวิตได้เพียง 16% ซึ่งถ้าโพโรทิวมีความหนาแน่นสูงก็จะมีอัตราการรอดที่สูง ฤทธิ์ต้านโพโรทิวมีขอบเขตของการออกฤทธิ์ที่กว้างโดยสามารถออกฤทธิ์ต่อ *Naegleria* 3 สายพันธุ์ และ *Acanthamoeba* 4 สายพันธุ์ ซึ่งโพโรทิวเหล่านี้มีรายงานว่าสามารถทนต่อการทำลายของคอมพลิเมนต์ของคน ฤทธิ์ต้านโพโรทิวนี้เกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 15 - 30 องศาเซลเซียส สามารถถูกทำลายการออกฤทธิ์ด้วยความร้อนและมีคุณสมบัติเป็นสารโปรตีน ถูกยับยั้งการทำงานด้วยกรดอีทีลินไดเอมีนที่ทราบชื่อ (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ซึ่งทำให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ต้องการไอออนโลหะใดวาเลนตีในการเกิดปฏิกิริยา และมีสมมุติฐานว่าคุณสมบัติของการออกฤทธิ์ต้านโพโรทิวของซิรั้มอัลลิเกเตอร์น่าจะเกิดจากการทำงานของระบบคอมพลิเมนต์เช่นกัน (Merchant *et al.*, 2004)

นอกจากนี้ยังพบการออกฤทธิ์ต้านไวรัสในซิรั้มอัลลิเกเตอร์ โดยการทดสอบในระดับเซลล์ของไวรัส 3 ชนิดที่มีส่วนห่อหุ้ม (enveloped virus) ได้แก่ Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-I), West Nile virus (WNV) และ Herpes simplex virus type I (HSV-I) โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งไวรัสได้ 50% (IC50) ที่ความเข้มข้นของซิรั้มเป็น 0.9%, 4.3% และ 3.4% ตามลำดับ ความเข้มข้นของซิรั้มในการทำลายไวรัสลง 50% (TC50) ต่อไวรัส HIV-I, WNV และ HSV-I เป็น 32.8%, 36.3% และ 39.1% ตามลำดับ การออกฤทธิ์ต้านไวรัส HIV-I ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน ซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของคอมพลิเมนต์ ในขณะที่การออกฤทธิ์ต้านไวรัส WNV และ HSV-I ทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนแสดงให้เห็นถึงกลไกในการออกฤทธิ์ต้านไวรัสแบบอื่นๆ ในซิรั้มของอัลลิเกเตอร์ (Merchant *et al.*, 2005a) ผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าอัลลิเกเตอร์ซึ่งเป็นสัตว์ดึกดำบรรพ์พวกเดียวกับจระเข้มีภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติที่มีมาแต่กำเนิดที่มีศักยภาพสูงในการทำลายไวรัสต่างๆ การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ปรสิต รวมถึงไวรัส HIV-I ของอัลลิเกเตอร์มาจากการทำงานของระบบคอมพลิเมนต์ในซิรั้มที่มีวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน

การศึกษาขั้นลึกในส่วนที่เกี่ยวข้องกับคอมพลิเมนต์ของซิรั้มอัลลิเกเตอร์พบว่าการทำงานหลักน่าจะเกิดจาก alternate pathway และเมื่อทดสอบซิรั้มอัลลิเกเตอร์ด้วยแอนติบอดีต่อ C3 ของคน พบการแสดงความเป็นแอนติเจนของโปรตีนที่คล้ายกับ C3 ของคน และเมื่อทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis พบว่าซิรั้มโปรตีนของอัลลิเกเตอร์มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ C3 ชนิดอัลฟาและบีต้าของคน ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของแกะแตกได้ในเวลาที่รวดเร็ว และมีเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 15 - 30 องศาเซลเซียส ผลของการวิจัยนี้สนับสนุนสมมุติฐานการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของซิรั้มอัลลิเกเตอร์เกี่ยวข้องกับการทำงานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อาศัย

สารน้ำ (humoral immune response) คล้ายกับที่เกิดขึ้นในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Merchant *et al.*, 2005b) ซึ่งต้องการไอออนโลหะไอวาเลนต์คือ Ca^{2+} และ/หรือ Mg^{2+} ในทำปฏิกิริยาให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ (Merchant *et al.*, 2005c) จระเข้ น้ำจืด ออสเตรเลีย (*C. johnstoni*) และจระเข้ น้ำเค็ม (*C. porosus*) มีการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์แบบ alternate pathway เช่นเดียวกับในอัลลิเกเตอร์

เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) ถูกสกัดจากเม็ดเลือดขาวของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตต่างๆ (Yeaman and Yount, 2003) โดยทั่วไปธรรมชาติของเพปไทด์ต้านจุลชีพมีความเป็นประจุบวกเพื่อที่จะสามารถเกิดอันตรกิริยากับฟอสโฟลิปิดที่มีประจุลบได้ เพปไทด์นี้อาจมีลักษณะเป็น amphipathic ทำให้มันสามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนใน (interior hydrophobic portions) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อตัวเป็นรูต่างๆ ที่เยื่อได้ การแสดงออกของเพปไทด์เหล่านี้เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อที่มีอันตรกิริยากับสิ่งแวดล้อม เช่น ปาก เยื่อบุลำไส้ ท่อทางเดินของอวัยวะสืบพันธุ์ และในเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดขาวสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้หลายชนิดที่มีขอบเขตศักยภาพในการต่อต้านที่สูง ได้แก่ nitrous oxide, hydrogen peroxide และ cationic antimicrobial peptides (Ganz and Lehrer, 2001) คุณสมบัติในการต้านจุลชีพของเม็ดเลือดขาวมีบทบาทที่สำคัญสำหรับภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดต่อการติดเชื้อที่เกิดภายนอกในระบบไหลเวียนเลือด เม็ดเลือดขาวต่างๆ จะเคลื่อนย้ายตัวเองไปยังบริเวณที่มีการติดเชื้อ เกิดการแตกของแกรนูโลเพื่อปล่อยสารต่อต้านจุลชีพที่ได้กล่าวข้างต้น ไปยังที่ที่มีการรุกรานจากเชื้อโรคในลักษณะแบบไม่จำเพาะ มีรายงานการพบเพปไทด์ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพในผิวหนังกบ (Lorin *et al.*, 2005) เม็ดเลือดขาวของคน (Garcia *et al.*, 2001) และ เม็ดเลือดขาวของแพะ/แกะ (Shamova *et al.*, 1999)

เมื่อปี ค. ศ. 2006 Merchant และคณะ (Merchant *et al.*, 2006) ได้รายงานการวิจัยว่า สารสกัดจากเม็ดเลือดขาวของอัลลิเกเตอร์ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ซึ่งฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ เหล่านี้เกิดจากเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความเป็นประจุบวก (cationic antimicrobial peptides) การศึกษานี้แยกเม็ดเลือดขาวออกจากเลือดครบของอัลลิเกเตอร์ป่า สกัดเม็ดเลือดขาวด้วยสารที่กรดความเข้มข้นต่างๆ ผ่านขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงและกรองที่มีความละเอียดสูงมาก จนได้สารที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 1-10 kDa ฤทธิ์ต้านจุลชีพเหล่านี้มีคุณสมบัติไวต่อโปรติเอส ทนต่อความร้อน และละลายได้ในสารละลายกรด สาร EDTA ความเข้มข้นสูงไม่มีผลการเกิดปฏิกิริยา การแสดงออกของเพปไทด์ต่างๆ ที่ได้จากเม็ดเลือดขาวของอัลลิเกเตอร์นี้มีความสำคัญต่อการนำไปใช้เป็นสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทางคลินิกต่อไป สำหรับจระเข้พันธุ์ไทยได้มีรายงานการศึกษา (สุวิทย์ และ สมปอง, 2550) ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยสามารถยับยั้ง

การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด และเชื้อรา 1 ชนิด คือ *Candida albican* เมื่อแยกบริสุทธิ์สารสกัดด้วยเทคนิค FPLC โดย Anion exchange column chromatography และนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้พันธุ์ไทยน่าจะจะมีโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการทำละลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราได้อย่างจำเพาะ

จากการสืบค้นข้อมูลสิทธิบัตรพบสิทธิบัตรเรื่องการใส่เปปไทด์จากสัตว์เลื้อยคลานเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อ (Hoffman and Binah: United States Patent 5380664/ International Patent WO9917785, 1999) ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากส่วนของฮีโมโกลบินจากเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลื้อยคลาน โดยเฉพาะในอัลลิเกเตอร์ ฮีโมโกลบิน ประกอบด้วย 4 สายของพอลิเพปไทด์ และ 4 heme prosthetic group ซึ่งมีธาตุเหล็กในสถานะ ferrous เป็นองค์ประกอบอยู่ภายใน โปรตีนกลอบิน (globin) 2 สาย ฮีโมโกลบินของสัตว์เลื้อยคลานพวกเต่า (Chelonia) จระเข้ (Crocodilia) และงู (Squamata) มีโครงสร้างที่จำเพาะ ฮีโมโกลบินของจระเข้และอัลลิเกเตอร์มีความพิเศษในการไม่ตอบสนองต่อสารอินทรีย์ฟอสเฟต แต่มีการควบคุมการทำงานหลักโดยไบคาร์บอเนตไอออน (bicarbonate ion) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกับออกซิเจนลดลง สิทธิบัตรนี้เกี่ยวข้องกับวิธีฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราด้วยฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ได้จาก reptilian hemoglobin protein, ชิ้นส่วนของฮีโมโกลบินโปรตีนหรือเปปไทด์ สายของฮีโมโกลบินที่ปราศจากฮีม (heme free hemoglobin chains) หรือชิ้นส่วนของโปรตีนหรือเปปไทด์ผสมของสารดังกล่าว

สิทธิบัตรฤทธิ์ต้านเนื้องอกจากซีรัมของสัตว์เลื้อยคลาน (Binah *et al.*: United States Patent 20040247589, 2004) เป็นการนำประโยชน์จากฤทธิ์ต้านเนื้องอกในซีรัมของสัตว์เลื้อยคลาน โดยเฉพาะในอัลลิเกเตอร์หรือจระเข้ องค์ประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ในโปรตีนหรือเปปไทด์ของซีรัมที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์เนื้องอกจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ที่ปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ส่วนแยกที่มีฤทธิ์จากซีรัมไม่แสดงความเป็นพิษในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่สุขภาพดี สารออกฤทธิ์ต้านเนื้องอกนี้อาจใช้ในการป้องกันการแผ่รังสี และการบำบัดรักษาเนื้องอกหรือมะเร็ง

นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้คิดค้น ประดิษฐ์ และพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้ปริมาณมาก (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549 ; อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5074, 4 กันยายน 2552 ; คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0801000372, 25 มกราคม 2551) ทำให้ได้วัตถุดิบเลือดจระเข้ที่สะอาดปลอดภัย สามารถขยายผลเชิงพาณิชย์ได้ และได้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบในรูปของแคปซูลเลือดจระเข้แห้ง เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร บำรุงร่างกาย

การเจาะเลือดเพื่อให้ได้วัตถุบดดังกล่าวกระทำในระชั่ก่อนการฆ่าและ การเจาะเลือดปริมาณโดยจระเข้ไม่ตายยังไม่มีรายงานมาก่อน การเอาเลือดมาจากสัตว์โดยไม่ตาย มักพบในการบริจาคเลือดของสุนัข (DeLuca *et al.*, 2006) แมว (Izbik *et al.*, 2007) ม้า (Malikides *et al.*, 2001)

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาระยะเวลาและปริมาณเลือดจระเข้ที่เหมาะสม ที่สามารถเก็บได้จากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

จระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทย ที่มีอายุมากกว่า 4- 5 ปี ขนาดความยาวเฉลี่ย มากกว่า 180 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ยมากกว่า 25 กิโลกรัม จำนวน 20 ตัว ที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มรุ่งทิวชัย จ. นครปฐม ทำการตีความหมายเลขให้กับจระเข้ จัดกลุ่มจระเข้ออกเป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 1 และ 2) คือ

1 **กลุ่มควบคุม** เจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ จำนวน 12 สัปดาห์ โดยใช้กระบอกเจาะเก็บเลือด ขนาด 10 มิลลิลิตร

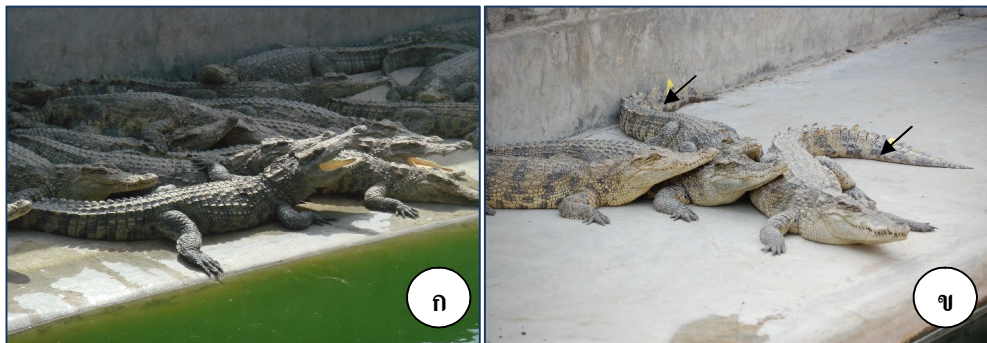
2 **กลุ่มทดลอง 1** ดูดเลือดปริมาณ 150 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 1 และ 12 โดยใช้หัวเข็มประดิษฐ์ ด้านหนึ่งต่อกับเข็มเจาะเลือด เบอร์ 16 อีกด้านหนึ่งต่อกับท่อยางซิลิโคน และใช้เครื่องปั๊มแบบบีบรัด ปั๊มเลือดเข้าขวดเก็บเลือดขนาด 4 ลิตร (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549) และเจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ ใช้กระบอกเจาะเก็บเลือด ขนาด 10 มิลลิลิตรตั้งแตสัปดาห์ที่ 2-11

3 **กลุ่มทดลอง 2** ดูดเลือดปริมาณ 150 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 1 และ 12 โดยใช้หัวเข็มประดิษฐ์ ด้านหนึ่งต่อกับเข็มเจาะเลือด เบอร์ 16 อีกด้านหนึ่งต่อกับท่อยางซิลิโคน และใช้เครื่องปั๊มแบบบีบรัด ปั๊มเลือดเข้าขวดเก็บเลือดขนาด 4 ลิตร (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549) และเจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร ใช้กระบอกเจาะเก็บเลือด ขนาด 10 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 4 และ 8

4 **กลุ่มทดลอง 3** ดูดเลือดปริมาณ 150 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 1 และ 12 โดยใช้หัวเข็มประดิษฐ์ ด้านหนึ่งต่อกับเข็มเจาะเลือด เบอร์ 16 อีกด้านหนึ่งต่อกับท่อยางซิลิโคน และใช้เครื่องปั๊มแบบบีบรัด ปั๊มเลือดเข้าขวดเก็บเลือดขนาด 4 ลิตร (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549)



ภาพที่ 1 คัดเลือกจระเข้ในบ่อเพาะเลี้ยงและจัดกลุ่มจระเข้



ภาพที่ 2 ก. จระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยอายุ 4-5 ปี ที่มีสุขภาพดี ที่นำมาคัดเพื่อจำแนกเข้ากลุ่มทดลอง ข. จระเข้ที่ได้เลือกเข้ากลุ่มทดลองและทำเครื่องหมายติดหางจระเข้ (ลูกศร)



ภาพที่ 3 ลักษณะของบ่อจระเข้ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

2 วิธีการเจาะเก็บเลือด เพื่อศึกษาค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีในเลือด

1. ใช้สาลีชุบ 70% แอลกอฮอล์ เช็ดบริเวณแฉ่งเลือดด้านหลังกระดูก (anterior dorsal sinus)

2. ใช้เข็มเจาะเลือดบริเวณแฉ่งเลือดด้านหลังกระดูก (ภาพที่ 4) โดยนำเลือดที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 นำเลือดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเก็บเลือดที่บรรจุสาร EDTA เขย่าหลอดเก็บเลือดให้เข้ากันดี เพื่อศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา

ส่วนที่ 2 นำเลือดปริมาณ 8 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเก็บเลือดที่บรรจุสารกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าชีวเคมีในเลือด และฮอร์โมน



ภาพที่ 4 การเจาะเลือดจระเข้โดยใช้กระบอกรวบรวมเลือด

3. เจาะเก็บเลือดปริมาณมากที่เหมาะสม ที่สามารถเจาะเก็บได้จากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้ (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549)

1. ใช้สาล์ชูบ 70% แอลกอฮอล์ เช็ดบริเวณแอ่งเลือดด้านหลังกระดูก (anterior dorsal sinus)

2. ใช้หัวเข็มประดิษฐ์ ด้านหนึ่งต่อกับเข็มเจาะเลือด เบอร์ 16 อีกด้านหนึ่งต่อกับท่อยางซิลิโคน และใช้เครื่องปั๊มแบบบีบรัด ปั๊มเลือดเข้าขวดเก็บเลือดขนาด 4 ลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เจาะเลือดบริเวณแอ่งเลือดด้านหลังกระดูก โดยนำเลือดที่ได้มาเข้าสู่กรรมวิธีการผลิตเลือดจระเข้แห้ง (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5074) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การเจาะเลือดจระเข้โดยใช้ หัวเข็มประดิษฐ์ ด้านหนึ่งต่อกับเข็มเจาะเลือด เบอร์ 16 อีกด้านหนึ่งต่อกับท่อยางซิลิโคน และใช้เครื่องปั๊มแบบบีบรัด ปั๊มเลือดเข้าขวดเก็บเลือด จำนวน 150 มิลลิลิตร

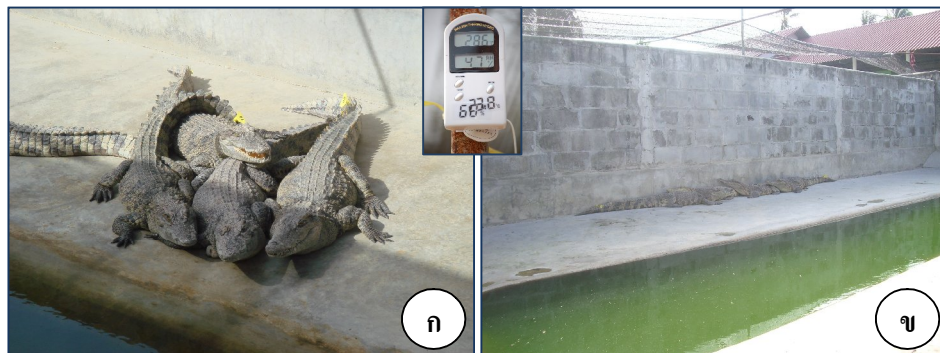
3. ตรวจสอบคุณภาพของเลือดจระเข้แห้ง โดยตรวจการปนเปื้อนสารปรอท (Lead : Pb) สารหนู (Arsenic : As) ปริมาณเชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. และ *Salmonella* sp.

4. รวบรวมข้อมูลและประเมินผลระยะเวลาและปริมาณเลือดจระเข้ที่เหมาะสม

3. ประเมินผลสุขภาพและพฤติกรรมจระเข้ก่อนและหลังการเจาะเก็บเลือด

3.1 การวัดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ วัดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ภายในบ่อเลี้ยง ตลอดการวิจัยครั้งนี้ (ภาพที่ 6)

3.2 การสังเกตพฤติกรรม หลังจากการเจาะเลือดทำการสังเกตพฤติกรรมการกินอาหาร และพฤติกรรมเคลื่อนที่ ว่ามีความผิดปกติหรือไม่ ทำการบันทึกพฤติกรรมลงในใบบันทึกพฤติกรรม



ภาพที่ 6 เครื่องวัดอุณหภูมิจึงและความชื้นสัมพัทธ์ ในบ่อทดลอง

3.3 การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา

1. ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน โดยวิธี Cyamethemoglobin
2. ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed Cell Volume or Hematocrit) โดยวิธี microhematocrit centrifugation
3. การนับจำนวนเม็ดเลือด ได้แก่ การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว และทรมอบไซท์ โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
4. การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวโดยวิธีการเสมียร์เลือด (Blood Smear)

3.4 การศึกษาค่าชีวเคมีในเลือดจระเข้

1. ศึกษาการทำงานของไตโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Hitashi 912, Japan) ณ สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อ.ศาลายา จ.นครปฐม
2. ศึกษาการทำงานของตับโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Hitashi 912, Japan) ณ สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อ.ศาลายา จ.นครปฐม
3. ศึกษาสภาวะน้ำตาลในเลือดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Hitashi 912, Japan) ณ สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อ.ศาลายา จ.นครปฐม

4. พัฒนาแนวทางในการผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ

1. ประเมินผล การพัฒนาวิธีการเจาะเก็บเลือดจระเข้ปริมาณมากโดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้ เพื่อใช้ในการเจาะเก็บเลือดปริมาณมากในศึกษาวิจัย
2. ประเมินผล ศักยภาพระยะเวลาและปริมาณเลือดจระเข้ที่เหมาะสม ที่สามารถเก็บได้จากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้
3. ประเมินผล สุขภาพและพฤติกรรมจระเข้ก่อนและหลังการเจาะเก็บเลือด

4. ร่างกรอบวิธีการผลิตเลือดจระเข้ระเหิดแห้ง จากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้ เพื่อเป็นนวัตกรรมใหม่ สำหรับอุตสาหกรรมจระเข้

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการเจาะเก็บเลือดจระเข้ทั้งหมดในตัวที่จะนำเข้าสู่โรงฆ่าและ จำนวน 30 ตัว จำแนกตามน้ำหนัก พบว่า จระเข้ น้ำหนักเฉลี่ย 22.71 ± 0.81 (mean \pm SE) กิโลกรัม มีปริมาตรเลือดทั้งหมดเฉลี่ย 598.33 ± 23.17 ลูกบาศก์เซนติเมตร รายละเอียดปริมาตรเลือดจระเข้จำแนกตามน้ำหนัก ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณเลือดจระเข้ทั้งหมดในจระเข้จำแนกตามช่วงน้ำหนัก

จำนวน	น้ำหนัก (mean \pm SE)	ปริมาณเลือด (mean \pm SE)
7	17.55 \pm 0.47	435.71 \pm 17.97
15	22.20 \pm 0.35	603.33 \pm 19.80
8	28.17 \pm 1.34	731.25 \pm 28.24
รวม (30)	22.71 \pm 0.81	598.33 \pm 23.17

การจัดเตรียมจระเข้และบ่อเลี้ยงจระเข้ที่ใช้ในการทดลอง ได้แบ่งกลุ่มการทดลอง ออกเป็น 4 บ่อ เพื่อปรับสภาพให้จระเข้คุ้นเคยกับบ่อทดลอง จนจระเข้กลับมากินอาหารเป็นปกติ เนื่องจากจระเข้เมื่อมีการจับเคลื่อนย้าย จระเข้จะเครียดหยุดการกินอาหารระยะหนึ่ง และเจาะเก็บเลือด

กลุ่มทดลอง เพื่อศึกษาค่าโลหิตวิทยา พบว่า มีปริมาณเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย $10.29 \pm 1.92 \times 10^5$ cell/dl ปริมาณเม็ดเลือดขาวเฉลี่ย $6.40 \pm 1.70 \times 10^3$ cell/dl เม็ดเลือดขาวชนิดเอทเทอโรฟิลเฉลี่ย 74.7 \pm 2.54% โมโนไซต์เฉลี่ย 1.3 \pm 0.51% ลิมโฟไซต์ 19.4 \pm 2.31% เบโซฟิลเฉลี่ย 0.2 \pm 0.2% อีโอซิโนฟิลเฉลี่ย 4.8 \pm 1.23%

ตารางที่ 2 ค่าโลหิตวิทยาของเลือดจระเข้ก่อนเริ่มทดลอง

Hb (g%)	RBC ($\times 10^5$ cell/dl)	WBC ($\times 10^3$ cell/dl)	Differential (%)				
			Het	Lym	Mo	Ba	Eo
7.05 \pm 1.48	10.29 \pm 1.92	6.40 \pm 1.70	74.7 \pm 2.54	19.40 \pm 2.31	1.3 \pm 0.51	0.20 \pm 0.20	4.8 \pm 1.23

ขนาดของจระเข้ในแต่ละบ่อแบ่งตามความยาว และน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 3 ความยาวเฉลี่ย (mean \pm SE กิโลกรัม) ของจระเข้ในน้ำจืดพันธุ์ไทย

กลุ่มที่ (N=3)	สัปดาห์ที่	
	1	12
1	189.14 \pm 3.08 ^{a, A}	189.33 \pm 1.76 ^{a, A}
2	189.00 \pm 1.84 ^{a, A}	188.50 \pm 3.50 ^{a, A}
3	190.60 \pm 2.08 ^{a, A}	188.33 \pm 4.18 ^{a, A}
4	197.33 \pm 7.95 ^{a, A}	199.50 \pm 0.50 ^{a, A}
เฉลี่ย	191.45 \pm 2.24	176.92

หมายเหตุ

อักษรพิมพ์เล็กต่างกันแถวบนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกันแถวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ย (mean \pm SE กิโลกรัม) ของจระเข้ในน้ำจืดพันธุ์ไทย

กลุ่มที่ (N=3)	สัปดาห์ที่	
	1	12
1	27.71 \pm 2.26 ^{a, A}	27.17 \pm 0.41 ^{a, A}
2	24.16 \pm 1.57 ^{a, A}	27.50 \pm 0.90 ^{a, A}
3	28.20 \pm 1.28 ^{a, A}	28.40 \pm 2.31 ^{a, A}
4	29.50 \pm 3.12 ^{a, A}	29.50 \pm 0.50 ^{a, A}
เฉลี่ย	27.37 \pm 1.13	27.39

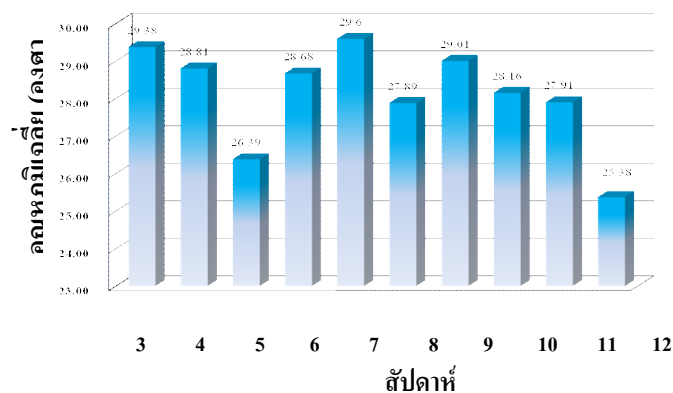
หมายเหตุ

อักษรพิมพ์เล็กต่างกันแถวบนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกันแถวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

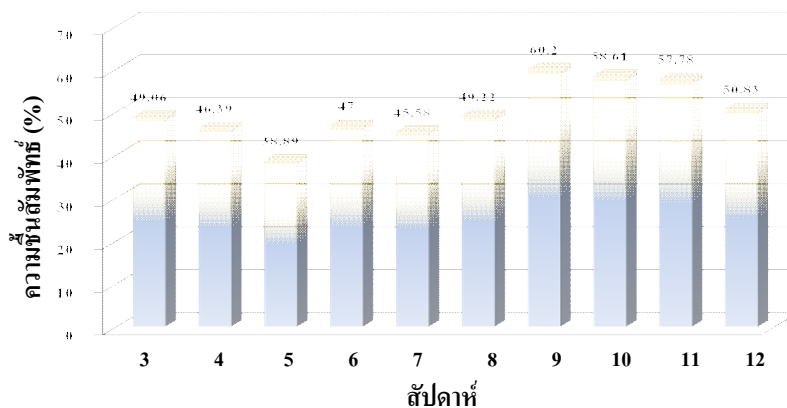
2.2. การวัดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์

อุณหภูมิภายในบ่อเลี้ยง สัปดาห์ที่ 1 ถึง 12 ของการทดลอง พบว่ามีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 28.12 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 7 แผนภูมิอุณหภูมิเฉลี่ย (องศาเซลเซียส) บริเวณบ่อเลี้ยงในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึง สัปดาห์ที่ 12

ความชื้นสัมพัทธ์ในบริเวณบ่อเลี้ยง สัปดาห์ที่ 3 ถึง 12 ของการทดลอง พบว่ามีค่าเฉลี่ย ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 50.35 %

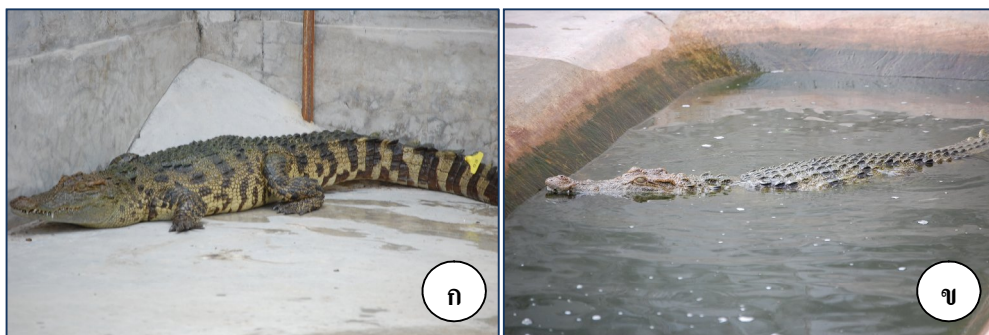


ภาพที่ 8 แผนภูมิความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์) บริเวณบ่อเลี้ยงในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึง สัปดาห์ที่ 12 ของการทดลอง

การสังเกตพฤติกรรม

หลังจากการเจาะเลือด พฤติกรรมการอาบแดด และการลงเล่นน้ำของจระเข้ในบ่อทดลองเป็นปกติ พฤติกรรมการกินอาหารกลุ่ม 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่าหลังจากเจาะเลือด จระเข้จะหยุดกินอาหารทันทีในสัปดาห์ต่อมา เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ จระเข้เริ่มกินอาหารในสัปดาห์ที่ 3 และหลังจากการเจาะเก็บเลือดสัปดาห์ที่ 4 จระเข้มีการปรับตัวโดยกินอาหารทุกครั้งหลังจากที่เจาะเก็บเลือด สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นมาจนกระทั่งสัปดาห์ที่ 12

พฤติกรรมการกินอาหารกลุ่ม 3 และ 4 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ 4 หลังจากเจาะเลือด 10 มิลลิลิตรเพื่อตรวจค่าเริ่มต้น จระเข้หยุดการกินอาหาร 2-3 สัปดาห์ เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ จระเข้เริ่มกินอาหารเป็นปกติจนถึงสัปดาห์ที่ 12 และกลุ่มที่ 3 หลังจากเจาะเก็บเลือดในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 จระเข้ก็หยุดการกินอาหาร 2-3 สัปดาห์ แล้วกลับมากินอาหารใหม่เช่นเดิม



ภาพที่ 9 ก) พฤติกรรม อาบแดด และ ข) พฤติกรรมลงเล่นน้ำ ของจระเข้ในบ่อทดลอง

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า จระเข้มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี มีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมโดยเฉพาะพฤติกรรมการกินอาหาร เช่นในกลุ่ม 1 และ 2 ที่หลังจาก สัปดาห์ที่ 4 ของการเจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร จระเข้จะกินอาหารในสัปดาห์ต่อมาทันที ซึ่งต่างกลุ่มที่ 3 และ 4 ที่จะหยุดการกินอาหารหลังจากเจาะเลือด 2-3 สัปดาห์

ศึกษาปริมาณเลือดจระเข้และระยะเวลาที่เหมาะสม ที่สามารถเจาะเก็บได้จากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้

จากการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา ก่อนการทดลองและเจาะเลือดเพื่อศึกษาผลกระทบจากการเจาะเก็บเลือดปริมาณ 150 มิลลิลิตร

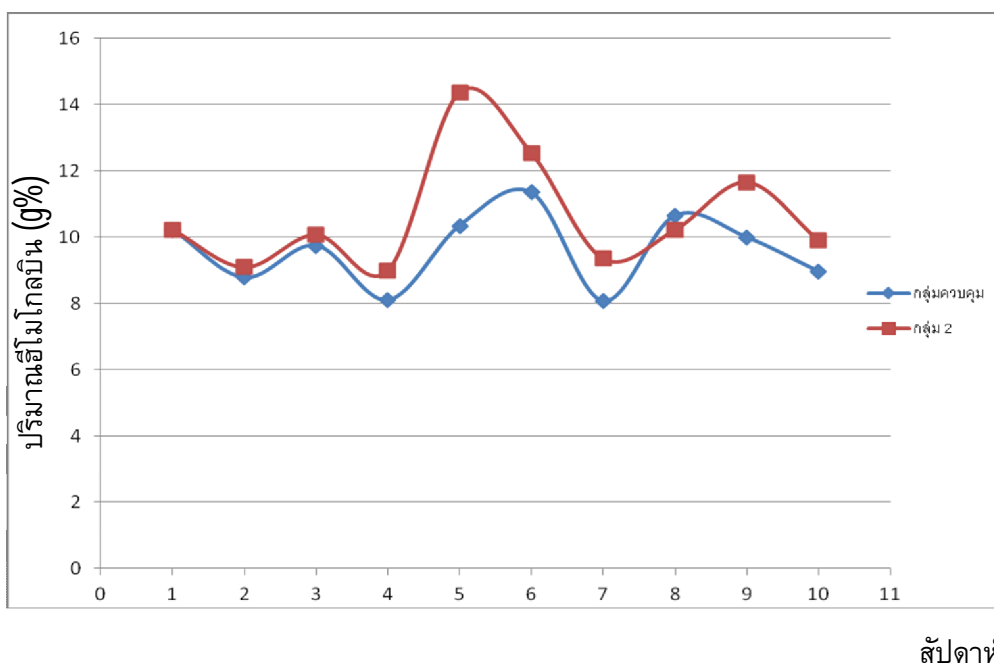
ก่อนการทดลองพบว่าค่าทางโลหิตวิทยา ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) เฉลี่ยของทุกกลุ่มทดลอง เท่ากับ $10.29 \pm 1.92 \times 10^5/\text{mm}^3$ ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) เฉลี่ยของทุกกลุ่มอายุ

$6.40 \pm 1.70 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ ปริมาณทอมโบซัยท์ (TCC) เฉลี่ยของทุกกลุ่มทดลอง $2.90 \pm 0.79 (\times 10^4/\text{mm}^3)$ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เฉลี่ยของทุกกลุ่มทดลอง $21.65 \pm 3.17(\%)$ และปริมาณฮีโมโกลบิน เฉลี่ยของทุกกลุ่มทดลอง $7.05 \pm 1.48 (\text{g/dl})$

หลังจากการเจาะเก็บเลือด 1 สัปดาห์ ของกลุ่มที่ 1 และ 2 พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาว ปริมาณทอมโบซัยท์ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และปริมาณฮีโมโกลบิน เฉลี่ยของกลุ่ม 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่เจาะเลือด 150 มิลลิลิตร เมื่อเริ่มการทดลอง มีค่าไม่แตกต่างกลุ่ม 1 หรือ กลุ่มควบคุม ที่เจาะเลือด 10 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 12 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การที่เจาะเสียเลือด 150 มิลลิลิตร หรือร้อยละ 25 ของเลือดในร่างกายไม่มีผลต่อการสร้างเลือดขึ้นมาทดแทน ในสัปดาห์ต่อไป รายละเอียดดังตาราง ที่ 5

สำหรับกลุ่มทดลอง 3 หลังจากการเจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 4 8 และ 12 และกลุ่มทดลอง 4 หลังจากการเจาะเก็บเลือด 150 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 0 และ 12 พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาว ปริมาณทอมโบซัยท์ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และปริมาณฮีโมโกลบิน มีค่าไม่แตกต่างกลุ่ม 1 2 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 12 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการที่เจาะเสียเลือด 150 มิลลิลิตร หรือร้อยละ 25 ของเลือดในร่างกายไม่มีผลต่อการสร้างเลือดขึ้นมาทดแทน ในสัปดาห์ต่อไป รายละเอียดดังตาราง ที่ 5

การเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบิน ของกลุ่ม 2 ซึ่งเจาะเลือด 150 มิลลิลิตร แล้วเจาะเลือด 10 มิลลิลิตรทุกสัปดาห์เทียบกับกลุ่มควบคุมที่เจาะเลือด 10 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ (ภาพที่) แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งกลุ่ม 2 มีการสร้างเม็ดเลือดแดงที่สูงกว่ากลุ่มทดลอง และมีการสร้างเม็ดเลือดสูงในสัปดาห์ที่ จากภาพ พบว่า ในช่วงสัปดาห์ที่ 5 และ 8 ซึ่งในช่วงดังกล่าวเมื่อพิจารณาอุณหภูมิ มีค่าเฉลี่ย สูงประมาณ 31 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า ในช่วงอุณหภูมิสูง การเสริมสร้างเม็ดเลือดจะมีการสร้างได้สูงกว่าในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า อันเนื่องมาจากกระแสเป็นสัตว์เลือดเย็น จะใช้สิ่งแวดล้อม ในการปรับอุณหภูมิในร่างกาย และจะมีภูมิคุ้มกันในร่างกายสูงกว่าอุณหภูมิต่ำ



ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินหลังจากการเจาะเก็บเลือด 150 มิลลิลิตร (กลุ่ม 2) เทียบกับกลุ่มควบคุม

2.4 ค่าทางชีวเคมี

ค่าทางชีวเคมีที่ศึกษา ได้แก่ Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine, Triglyceride, Total protein, Albumin, Globulin, ALT, AST ค่าทางชีวเคมีบางประการของกระชังในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของการทดลอง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าการเจาะเก็บเลือดปริมาณมาก ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของตับ ไต และไม่ทำให้เกิดสภาวะเบาหวานในกระชัง (ตารางที่ 6)

2.5 ค่าโลหิตวิทยา

ค่าโลหิตวิทยาของกระชัง ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4 ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของการทดลอง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการเจาะเก็บเลือดปริมาณมาก ไม่มีผลกระทบต่อค่าทางโลหิตวิทยา แสดงให้เห็นว่าการเจาะเก็บเลือดไม่มีการติดเชื้อในเลือด และไม่มีอาการอักเสบ โดยสังเกตได้จากปริมาณเม็ดเลือดขาวในแต่ละครั้งของการเจาะเก็บเลือด กระชัง อยู่ในระดับที่ปกติ ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ตลอดการทดลอง และไม่มีการตายของกระชัง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ค่าทางชีวเคมีบางประการของจระเข้ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของการทดลอง

ค่าทางชีวเคมี	กลุ่มที่ 1		กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		กลุ่มที่ 4	
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12
BUN (mg/dl)	1.23±0.20 ^{a,A}	1.40±0.32 ^{a,A}	2.60±0.70 ^{a,A}	2.10±0.40 ^{a,A}	1.50±0.15 ^{a,A}	1.50±0.50 ^{a,A}	1.85±0.15 ^{a,A}	1.90±0.0 ^{a,A}
Creatinine (mg/dl)	0.05±0.005 ^{a,A}	0.37±0.37 ^{a,A}	0.07±0.01 ^{a,A}	0.03±0.01 ^{b,A}	0.06±0.01 ^{a,A}	0.04±0.02 ^{a,A}	0.05±0.01 ^{a,A}	0.04±0.02 ^{a,A}
Cholesterol (mg/dl)	269.67±37.55 ^{a,A}	158.33±12.03 ^{a,A}	314.0±27.0 ^{a,A}	237.0±12.0 ^{a,A}	268.67±28.17 ^{a,A}	223.0±40.4 ^{a,A}	343.0±0.0 ^{a,A}	294.5±1.50 ^{b,A}
Triglyceride (mg/dl)	71.0±11.27 ^{a,A}	12.0±3.46 ^{a,A}	171.50±159.50 ^{a,A}	14.0±1.0 ^{a,A}	68.67±26.42 ^{a,A}	26.67±11.78 ^{a,A}	59.0±21.0 ^{a,A}	91.5±62.50 ^{a,A}
Total protein (g/dl)	6.07±0.89 ^{a,A}	4.61±1.02 ^{a,A}	7.1±0.42 ^{a,A}	7.14±0.47 ^{a,A}	6.88±0.16 ^{a,A}	7.25±0.06 ^{a,A}	6.60±0.21 ^{a,A}	7.18±0.50 ^{a,A}
Albumin (g/dl)	1.37±0.20 ^{a,A}	1.03±0.20 ^{a,A}	1.55±0.5 ^{a,A}	1.5±0.0 ^{a,A}	1.60±0.0 ^{a,A}	1.60±0.0 ^{a,A}	1.65±0.05 ^{a,A}	1.55±0.05 ^{a,A}
Globulin (g/dl)	4.70±0.70 ^{a,A}	3.53±0.81 ^{a,A}	5.55±0.35 ^{a,A}	5.65±0.45 ^{a,A}	5.27±0.15 ^{a,A}	5.67±0.07 ^{a,A}	49.5±0.15 ^{a,A}	5.65±0.45 ^{a,A}
AST (U/L)	57.30±9.67 ^{a,A}	35.60±4.27 ^{a,A}	64.80±21.60 ^{a,A}	39.35±15.65 ^{a,A}	48.77±4.27 ^{a,A}	33.33±1.89 ^{b,A}	48.40±9.20 ^{a,A}	42.10±1.30 ^{a,A}
ALT (U/L)	33.87±9.34 ^{a,A}	16.20±2.25 ^{a,A}	43.35±11.55 ^{a,A}	20.50±8.0 ^{a,A}	31.0±1.36 ^{a,A}	21.13±2.49 ^{b,A}	34.85±0.85 ^{a,A}	22.30±1.80 ^{b,A}

หมายเหตุ

อักษรพิมพ์เล็กต่างกันในแถวอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในกลุ่มทดลองเดียวกัน ($p < 0.05$)

อักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกันแถวอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองต่างกันในเวลาเดียวกัน ($p < 0.05$)

ตารางที่ 7 ค่าโลหิตวิทยาของจระเข้ ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของการทดลอง

ค่าทางโลหิตวิทยา	กลุ่มที่ 1		กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		กลุ่มที่ 4	
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 12
Hb (g/dl)	7.12±1.46 ^{a,A}	6.3±0.35 ^{a,A}	8.70±0.69 ^{a,A}	8.85±0.34 ^{a,A}	8.29±0.27 ^{a,A}	8.92±0.92 ^{a,A}	8.44±0.09 ^{a,A}	8.81±0.07 ^{a,A}
Hct (%)	22.50±2.50 ^{a,A}	19.67±1.42 ^{a,A}	22.83±3.90 ^{a,A}	27.75±0.75 ^{a,A}	25.67±1.76 ^{a,A}	26.50±1.76 ^{a,A}	26.67±0.33 ^{a,A}	27.75±0.25 ^{a,A}
RBC (10 ⁵ /mm ³)	5.98±0.03 ^{a,A}	5.23±0.23 ^{a,A}	8.22±0.83 ^{a,A}	8.13±0.58 ^{a,A}	7.35±0.30 ^{a,A}	7.68±1.53 ^{a,A}	8.53±0.64 ^{a,A}	7.35±0.90 ^{a,A}
MCV (fl)	376.40±40.27 ^{a,A}	394.72±55.28 ^{a,A}	296.11±64.36 ^{a,A}	342.61±15.02 ^{a,A}	349.35±2.67 ^{a,A}	363.23±48.17 ^{a,A}	315.50±20.03 ^{a,A}	382.88±43.49 ^{a,A}
MCH (pg)	119.90±16.74 ^{a,A}	120.97±9.95 ^{a,A}	106.52±4.38 ^{a,A}	109.13±3.59 ^{a,A}	112.83±1.51 ^{a,A}	120.64±12.07 ^{a,A}	99.88±6.19 ^{a,A}	121.82±15.88 ^{a,A}
MCHC (g/dl)	31.53±1.08 ^{a,A}	30.90±1.81 ^{a,A}	40.69±8.69 ^{a,A}	31.87±0.35 ^{a,A}	32.30±1.19 ^{a,A}	33.52±1.19 ^{a,A}	31.66±0.18 ^{a,A}	31.76±0.55 ^{a,A}
WBC (10 ³ /mm ³)	5.54±2.36 ^{a,A}	4.84±1.43 ^{a,A}	4.18±1.39 ^{a,A}	6.99±0.61 ^{a,A}	4.95±0.44 ^{a,A}	3.48±0.51 ^{a,A}	5.87±0.22 ^{a,A}	4.07±0.0 ^{b,A}
Differential leucocyte count								
Heterophil (%)	71.0±4.27 ^{a,A}	62.67±16.86 ^{a,A}	63.83±5.86 ^{ab,A}	46.5±2.0 ^{b,A}	58.83±4.06 ^{a,A}	52.50±2.89 ^{a,A}	64.0±4.50 ^{a,A}	52.0±14.0 ^{a,A}
Lymphocyte (%)	27.33±4.48 ^{a,A}	36.83±17.84 ^{a,A}	31.83±9.93 ^{a,A}	51.0±0.50 ^{b,A}	35.17±6.12 ^{a,A}	42.0±3.79 ^{a,A}	34.0±4.01 ^{a,A}	39.50±8.0 ^{a,A}
Eosinophil (%)	0.50±0.50 ^{a,A}	0.83±0.44 ^{a,A}	2.67±0.44 ^{a,B}	1.25±0.75 ^{a,A}	1.50±0.29 ^{a,AB}	2.0±1.04 ^{a,A}	1.0±0.50 ^{a,A}	1.0±1.0 ^{a,A}
Basophil (%)	0.17±0.17 ^{a,A}	1.0±0.50 ^{a,A}	0.50±0.0 ^{a,A}	0.75±0.75 ^{a,A}	0.17±0.17 ^{a,A}	1.67±0.88 ^{a,A}	0.5±0.29 ^{a,A}	2.25±1.25 ^{a,A}
Monophil (%)	1.0±0.58 ^{a,A}	0.67±0.17 ^{a,A}	1.17±0.73 ^{a,A}	0.5±0.0 ^{a,A}	1.0±0.29 ^{a,A}	1.17±0.17 ^{a,A}	0.33±0.33 ^{a,A}	3.0±1.50 ^{a,A}
Thrombocyte/100WBC	166.83±13.88 ^{a,A}	297.83±56.19 ^{a,A}	199.33±25.42 ^{a,A}	352.75±5.75 ^{a,A}	248.33±26.59 ^{a,A}	333.67±15.62 ^{a,A}	341.83±112.93 ^{a,A}	508.50±62.50 ^{a,A}

หมายเหตุ

อักษรพิมพ์เล็กต่างกันในแถวอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในกลุ่มทดลองเดียวกัน (p<0.05)

อักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกันแถวอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองต่างกันในเวลาเดียวกัน (p<0.05)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

การเจาะเก็บเลือดปริมาณมาก 150 มิลลิลิตร หรือ 25% ของปริมาณเลือดในร่างกายของจระเข้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยา ไม่มีผลต่อสุขภาพของจระเข้ และสภาพการทำงานของไต ตับ ถึงแม้ว่าจระเข้มีอาการเครียดในช่วงสัปดาห์แรก แต่เมื่อจระเข้ถูกจับและรบกวนบ่อยๆ ทำให้จระเข้ปรับตัวได้ เห็นได้จากการที่จระเข้มีพฤติกรรมกรอกินอาหารในช่วงสัปดาห์ถัดมา โดยไม่พักตัวนานเหมือนการเจาะเก็บในครั้งแรก และเนื่องจากจระเข้จัดเป็นสัตว์เลือดเย็นที่สามารถปรับตัวโดยใช้สภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีมาก ประกอบกับสภาพอากาศในรอบฟาร์ม มีอากาศร้อน ทำให้การเสริมสร้างเลือดได้ดีมาก โดยดูได้จากปริมาณเม็ดเลือดในสัปดาห์ที่ 4 ของการเจาะเลือด ที่มีปริมาณสูงกว่าในสัปดาห์ก่อนและหลังที่มีอากาศเย็นกว่า พฤติกรรมที่ไม่กินอาหาร

จระเข้ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเจาะเลือด 150 มิลลิลิตร และมีการเสริมสร้างเม็ดเลือดขึ้นมาในสัปดาห์ต่อมาโดยไม่มี ความแตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม และมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเล็กน้อย อาจจะเป็นปัจจัยที่มาจากในสัปดาห์นั้นมีอุณหภูมิสูงขึ้นมา การปรับตัวของจระเข้ซึ่งเป็นสัตว์เลือดเย็น ปรับตัวได้เร็ว เพราะเนื่องจากจระเข้เป็นสัตว์ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมมาก ขณะจับจระเข้จะมีการส่งเสียง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อจระเข้ บ่อยข้างเคียงมาก แต่เมื่อเทียบการเจาะเลือดครั้งต่อๆ มา พบว่าจระเข้กลับมากินอาหารเร็วกว่าครั้งแรก มากอาจจะเนื่องจากจระเข้มีความเคยชินกับการถูกจับ ทำให้ไม่เกิดความเครียดมาก (Huchzermeyer, 2003)

การชั่งน้ำหนักและวัดความยาวจระเข้ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของจระเข้ทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันระหว่างสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 12 ของการทดลอง และไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม (ตารางที่ 1 และ 2)

การสังเกตการเป็นอยู่ของจระเข้พบว่าจระเข้ขึ้นมาอาบน้ำตามปกติ พฤติกรรมกรอกินอาหาร พบว่าจระเข้กินอาหารลดน้อยลงในช่วง 2-3 สัปดาห์หลังจากการเจาะเลือด และกลับมากินอาหารอีกครั้งเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งจระเข้ทั้ง 2 บ่อมีแนวโน้มในการกินอาหารเป็นไปในทางเดียวกันแม้ว่าไม่มีการเจาะเลือดจระเข้ในกลุ่มที่ 3 และ 4 เกิดจากการถูกรบกวน จากการจับและการส่งเสียงเตือนภัยเมื่อถูกรบกวน หรืออยู่ในอันตราย ซึ่งจากการศึกษาของ Britton (2001) พบว่าเสียงร้องจระเข้สามารถแบ่งออกเป็น เสียงร้องเมื่อออกจากไข่ เสียงร้องในการติดต่อสื่อสาร เสียงร้องขู่ เสียงร้องเมื่อรู้สึกโกรธ และเสียงร้องเตือนภัย เสียงร้องของจระเข้ใช้เสียงทั้งที่มนุษย์สามารถรับฟังได้และไม่สามารถรับฟังได้ ซึ่งเป็นเสียงความถี่ต่ำและสามารถเดินทางได้ไกลใช้ในสื่อสารในกลุ่มจระเข้ (Huchzermeyer, 2003) จระเข้จะกินอาหารเพิ่มขึ้นหลังจากการเจาะเลือดประมาณ 2 สัปดาห์

การเก็บข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์บริเวณบ่อเลี้ยงในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึง 12 พบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยบริเวณบ่อเลี้ยงสูงสุด เท่ากับ 31.00 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเฉลี่ยต่ำสุดในช่วงสัปดาห์ เท่ากับ 25.38 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 7) ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยบริเวณบ่อเลี้ยงสูงสุด เท่ากับ 60.2 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น

สัมพัทธ์เฉลี่ยบริเวณบ่อเลี้ยงต่ำสุด 5 เท่ากับ 38.89 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8) จะเห็นว่าอุณหภูมิและความชื้น เป็นสภาพโดยทั่วไปของประเทศในเขตร้อน และจระเข้ก็เป็นสัตว์เลือดเย็น ที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนของโลก จะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม โดยการใช้แหล่งน้ำในบ่อเลี้ยงเป็นตัวช่วย (Morgan, 2007) ซึ่งจะทำให้ภูมิคุ้มกันในร่างกายอยู่ในระดับปกติ

ค่าทางโลหิตวิทยา จากการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง และภายในกลุ่มการทดลองเดียวกันที่ สัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของการทดลอง พบว่าส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่าการเจาะเก็บเลือดปริมาณ 150 มิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยาของจระเข้ ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์หลายชนิดเช่น จากการศึกษาต่อการตอบสนองของค่าทางโลหิตวิทยาต่อการเจาะเก็บเลือดซ้ำทุก 3 สัปดาห์ในม้า พบว่าการเจาะเลือดไม่มีผลต่อค่าฮีมาโทคริต ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดง แม้ว่าค่าเหล่านี้จะลดลงในช่วงสัปดาห์แรกของการเจาะเลือด และค่อยๆเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีการเจาะครั้งต่อไป (Malikides *et al.*, 2000)

ค่าทางชีวเคมี (ตารางที่ 6) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลอง และภายในกลุ่มการทดลองเดียวกันที่สัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของการทดลอง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นที่เวลาเดียวกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน คอเลสเทอรอลของกลุ่มที่ 4 แตกต่างกับเมื่อเปรียบเทียบกับค่าระหว่างสัปดาห์ที่ 1 และ สัปดาห์ที่ 12 ของการทดลอง คาดว่าอาจเกิดจากอาหารที่กิน เนื่องจากจระเข้ไม่ได้อดอาหารก่อนการเจาะเลือด ปริมาณคอเลสเทอรอลที่สูงยังแสดงให้เห็นว่าจระเข้มีการกินอาหาร AST และ ALT อยู่ในช่วงปกติเมื่อนำค่าเทียบกับค่าของจระเข้แม่น้ำเค็ม (*Crocodylus porosus*) (ตารางที่ 3)

ปริมาณเลือดทั้งหมดของจระเข้ในร่างกายมีค่าประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว (Huchzermeyer, 2003) การเจาะเลือดครั้งนี้เจาะเพียง 150 มิลลิลิตร ซึ่งประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของเลือดทั้งหมดในร่างกาย Malikides *et al.* (2001) ศึกษาผลกระทบของการเจาะเลือดปริมาณมากต่อการตอบสนองทางโลหิตวิทยา ทางชีวเคมี ระบบหมุนเวียนเลือดในม้า สรุปว่าปริมาณเลือดที่เหมาะสมที่สามารถเจาะได้จากม้า คือ ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเลือดทั้งหมดสามารถกลับสู่ภาวะปกติอย่างรวดเร็วภายใน 24-48 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่า การเจาะเลือดทำให้อัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเจาะเก็บเลือด แล้วลดลงหลังจากการเจาะเก็บเลือด 1-2 ชั่วโมง และกลับสู่ปกติหลังจากเจาะเลือด 31 วัน

จากผลการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต พบว่าจระเข้ที่ถูกเจาะเก็บเลือด 150 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีพฤติกรรมความเป็นอยู่ที่ปกติ ค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางฮอร์โมน และค่าทางชีวเคมี ไม่แตกต่างจากจระเข้ปกติ แสดงให้เห็นว่าการเจาะเลือดจระเข้ปริมาณ 150 มิลลิลิตรไม่มีผลต่อสุขภาพจระเข้ แสดงให้เห็นว่าเลือดที่เจาะเก็บได้มีคุณภาพที่เป็นที่ยอมรับได้ ซึ่งในเชิงพาณิชย์การที่จะนำเลือดจระเข้มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สามารถทำได้โดยไม่ทำลายชีวิต

แนวทางในการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพโดยไม่ทำลายชีวิตจระเข้มีความเป็นไปได้สูงมาก ซึ่งขณะนี้สามารถเจาะเลือดได้ 150 มิลลิลิตร โดยไม่กระทบต่อสุขภาพของจระเข้ และช่วงระยะเวลาในการเจาะแต่ละครั้ง ห่างกันไม่น้อยกว่า 12 สัปดาห์ หรือ 3 เดือน ซึ่งเป็นนวัตกรรมในอุตสาหกรรมจระเข้ที่มีอยู่ในปัจจุบัน

2. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาปริมาณเลือดที่มากขึ้นต่อไปเพื่อให้ได้ปริมาณ ที่มากและไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพของจระเข้ ต่อไป และถ่ายทอดให้แก่เกษตรกรที่เลี้ยงจระเข้ เพื่อเป็นการส่งเสริมการผลิต ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากเลือดจระเข้ที่สะอาดปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

บรรณานุกรม (Bibliography)

- ชยันต์ พิเชียรสุนทร และวิเชียร จีรวงส์. *คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 3: เครื่องยาสัตว์วัตถุ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อมรินทร์, 2546 : 150-167.
- วิน เขยชมศรี จินดาวรรณ สิริพันธุ์ บัญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ตันติรุ่งกิจ สุดาวรรณ เขยชมศรี ยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปพัน. 2546. ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด*. 15 (ฉบับเพิ่มเติมที่ 1). S120.
- สุวิทย์ รัทมนิ และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*). *รายงานการวิจัยโครงการอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรี ประจำปี 2549*. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม.
- Betkot, Z. 2001. The nutritional value of cattle blood. *Medycyna Weterynaryjna* 57 (6) : 412-414.
- Betkot, Z. and E., Petczyn'ska. 2002. Eating value of chicken blood. *Medycyna Weterynaryjna* 58 (3) : 208-210.
- Binah, O., Ciechanover, A. and Maor, G. Anti-tumor activity from reptile serum. *United States Patent* 20040247589. December 2004.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetai, J., Pokharatsiri, A., Vajarasathira, B., Chitchuankij, N. and Temsiripong, Y. 2004b. Effects of Crocodile Blood Consumption on Biochemical Changes in Wistar Rats. In: *Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand*. 19-21 October, 2004. Bangkok.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetai, J., Vajarasathira, B. and Temsiripong, Y. 2006. Safety Evaluation of Crocodile Blood Diet. In: *Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*. 10-12 October, 2006. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetai, J., Vajarasathira, B., Komoljindakul, K., Ong-aat, T. and Temsiripong, Y. 2004a. Intestinal Parasites of Freshwater Crocodile, *Crocodylus siamensis*, in Thailand. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*. 24-29 May, 2004. Darwin Australia.
- DeLuca, L. A., Glass, S.G., Johnson R.E. and Burger, M. 2006. Description and evaluation of a canine volunteer blood donor program. *J. Applied Ani. Welfare Science* 9 (2) : 129-141.
- Flajnik, M. F. and Pasquier, L. Du. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?. *Trends in Immunology*. 25 (12): 640-644.

- Ganz, T. and Lehrer, R. 2001. Antimicrobial peptides in innate immunity. In: *Development of novel antimicrobial agents, emerging strategies*. Horizon Scientific Press : UK, pp. 138-147.
- Garcia, J., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F., Kluver, E., Andermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R. and Forssmann, W. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 10 : 1819-1821.
- Hartmann, R. and Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotech* 18 : 163-169.
- Hoffman, B. F. and Binah, O. Reptilian-derived peptides for the treatment of microbial infection. *United States Patent 5380664/ International patent WO9917785*. July 1999.
- Iazbik, M.C., Ochoa, P.G., Westendorf, N., Charske, J. and Couto, C.G. 2007. Effects of blood collection for transfusion on arterial blood pressure, heart rate, and PCV in cats. *J. Vet. Inter. Med.* 21 (6) : 1181-1184.
- Ji, H., Reid, G. E., Moritz, R. L., Edds, J. S., Burgess A. W. and Simpson, R. J. 1997. A two-dimensional gel database of human colon carcinoma proteins. *Electrophoresis* 18:605-613.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lorin, C., Saidi, H., Belaid, A., Zairi, A., Baleux, F., Hocini, H., Belec, L., Hani K. and Tangy, F. 2005. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology* 334 : 264-275.
- Malikides, N., Hodgson, J. L., Rose, R. J. and Hodgson, D. R. 2001. Cardiovascular, Haematological and Biochemical Responses after Large Volume Blood Collection in Horses. *Vet. J.* 162 (1) : 44-55.
- Manso, M. A., Leonil, J., Jan G. and Gagnaire, V. 2005. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. *Int. Dair. J.* 15 : 845-855.
- Merchant, M. E., Verret B. and Elsey, R. M. 2005c. Role of divalent metal ions in serum complement activity of the the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physio. B.* 141 : 289-293.
- Merchant, M. E., Roche, C., Thibodeaux, D. and Elsey, R. M. 2005b. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physio. B.* 141 : 281-288.

- Merchant, M. E., Roche, C., Elsey, R. M. and Prudhomme, J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physio. B.* 136 : 505-513.
- Merchant, M. E., Thibodeaux, D., Loubser K. and Elsey, R. M. 2004. Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Parasit.* 90 : 1480-1483.
- Merchant, M. E., Pallansch, M., L. Paulman, R., Wells, J. B., Nalca A. and Ptak, R. 2005a. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiv. Res.* 66 : 35-38.
- Merchant, M. E., Leger, N., Jerkins, E., Mills, K., Pallansch, M. B., Paulman R. L. and Ptak, R. 2006. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet. Immun. Immuno.* 110 : 221-228.
- Perutz, M. F., Bauer, C., Gros, G., Leclercq, F., Vandecasserie, C., Schnek, A. G., Braunitzer, G., Friday A. E. and Joysey, K. A. 1981. Allosteric Regulation of Crocodilian Haemoglobin. *Nature* 291, 682-684
- Petczyn'ska, E. and Libelt, K. 1999. The biological value of slaughter-animals blood. *Medycyna Weterynaryjna* 55 (9) : 600-601.
- Shaharbanay, M., Gollop, N., Ravin, S., Golomb, E., Demarco, L., Ferreira, P., Boson W. and Friedman, E. 1999. Naturally occurring antibacterial activities of avian and crocodile tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* 44 : 416-418.
- Shamova, O., Brogden, K., Zhao, C., Nguyen T. and Kokryako, V. L. 1999. Purification and properties of praline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocyte. *Infect. Immun.* 67 : 4106-4111.
- Siruntawineti J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Ong-aat, T. and Temsiripong, Y. 2004a. Efficacy of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Serum on Bacterial Growth Inhibition. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.* 24-29 May 2004, Darwin Australia.
- Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B. and Temsiripong, Y. 2006. Development and Evaluation of Dried Siamese Crocodile Blood Product. In: *Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.* 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.
- Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W, Vajarasathira, B., Tuntirungkij, M. and Temsiripong, Y. 2003. Complement Activity of Thai Freshwater Crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. In:

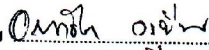

- Proceeding of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand.* 20-22 October, 2003. Khon Kaen.
- Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Pokharatsiri, A., Vajarasathira, B., Chitchuankij, N. and Temsiripong, Y. 2004c. Crocodile Blood as Food Supplement: Its Effects on Hematological Values in Wistar Rats. In: *Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand.* 19-21 October, 2004. Bangkok.
- Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Ritwichai, A., Ong-aat, T. and Temsiripong, Y. 2004b. Blood Parasites of *Crocodylus siamensis* in Thailand. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.* 24-29 May 2004, Darwin Australia.
- Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B. and Temsiripong, Y. 2005. Evidence for Primary Immune Response to *Salmonella paratyphi A* in Wistar Rats after Feeding by crocodile Blood. In: *Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand.* 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.
- Yeaman, M. and Yount, N. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55 : 27-55.

ภาคผนวก (Appendix)

1. สำเนาใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์
2. สำเนาอนุสิทธิบัตรเลขที่ 7468 ลงวันที่ 14 กันยายน 2555

สำเนาใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์

แบบฟอร์มใบรับรอง

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์	
ID #.....OACKV 00151	
ชื่อข้อเสนอการวิจัย	
(ภาษาไทย) . การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจากจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต.	
(ภาษาอังกฤษ) Process Development for Crocodile Blood Collection with Crocodile Life Maintaining	
ชื่อ-สกุล	ผู้เสนอข้อเสนอการวิจัย.....รศ.ดร. วิน เชชมศรี.....
	หน่วยงานที่สังกัด (คณะ/กอง).....คณะวิทยาศาสตร์.....
	(มหาวิทยาลัย/กรม).....มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.....
	(กระทรวง).....กระทรวงศึกษาธิการ.....
ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับ	
จรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ ตามที่ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้	
ลงนาม	 (พ.ศ. ๐๖๓๖๑ ๐๖๖๖)
ตำแหน่ง	ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของหน่วยงาน
วัน /เดือน /ปี 1๙๙5
	 รองศาสตราจารย์ ดร. สัมคิณี นุชเยะวัฒน์ (รองอธิการบดีฝ่ายวิจัย) ตำแหน่ง หัวหน้าส่วนราชการ
	วัน /เดือน /ปี 16 ๐๑ 51

เลขที่อนุสิทธิบัตร 7468

อสป/200 - ข



อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
บทกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถ้อยสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี)
ปรากฏในอนุสิทธิบัตร

เลขที่คำขอ 0903001362
วันขอรับอนุสิทธิบัตร 20 พฤศจิกายน 2552
ผู้ประดิษฐ์ นายวิน เซยชมศรี และคณะ

เพื่อแสดงถึงการประดิษฐ์ กรรมวิธีการเจาะเก็บเลือดจะเข้โดยไม่ทำลายชีวิต

ให้ผู้ทรงสิทธิมีสิทธิหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ 14 เดือน กันยายน พ.ศ. 2555
หมดอายุ 19 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2558

(ลงชื่อ)



พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ
 2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวกันได้
 3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง
มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ
 4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่